

## DETECTION OF ENTEROVIRUS AND DISCRIMINATION OF THE SAME

Patent number:	JP6311900
Publication date:	1994-11-08
Inventor:	NARISAWA TADASHI; ISHIKO HIROAKI; SAKAE KENJI; ISHIHARA YUUICHI; TAKEDA NAOKAZU; MIYAMURA KIKUKO; INOUE SAKAE
Applicant:	MITSUBISHI YUKA B C L KK; INOUE SAKAE
Classification:	
International:	C12Q1/70; C12N15/41
- european:	
Application number:	JP19930102254 19930428
Priority number(s):	JP19930102254 19930428

### Abstract of JP6311900

**PURPOSE:** To detect Picornaviridae such as Enterovirus, etc., by amplifying a Specific region of Enterovirus and detecting amplified gene DNA. **CONSTITUTION:** An oligonucleotide (e.g. CTACTTTGGGTGTCCGTGTT) having complementarity to a common type part in the upstream of a gene region coding a part of 5'-non-translated region of Enterovirus, a part of VP4 and VP2 proteins, and an oligonucleotide (e.g. TGGTGGTGGAAAGTTGCCTGA) having complementarity to a common type part in the downstream are subjected to be primers of the PCR method. The amplified gene DNA is detected by polyacrylamide gel electrophoresis, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-311900

(43)公開日 平成6年(1994)11月8日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/70		7823-4B		
// C 1 2 N 15/41	Z N A	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平5-102254

(22)出願日 平成5年(1993)4月28日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月28日～  
10月30日、日本ウイルス学会主催の「第40回日本ウイル  
ス学会総会」にて文書をもって発表

(71)出願人 591122956

株式会社三菱油化ビーシーエル  
東京都板橋区志村3-30-1

(71)出願人 593083538

井上 栄  
東京都新宿区戸山1-23-1 国立予防衛  
生研究所内

(72)発明者 成澤 忠

東京都板橋区志村3-30-1 株式会社三  
菱油化ビーシーエル内

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンテロウイルスの検出および識別方法

(57)【要約】

【構成】 (i) エンテロウイルスの5'-非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、エンテロウイルスの5'-非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、(ii) 該増幅遺伝子DNAを検出することを特徴とするエンテロウイルスの検出法。

【効果】 本発明の方法によれば、高い精度で簡便にエンテロウイルスの検出および血清型の識別が可能である。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つV p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、

(ii) 該増幅遺伝子DNAを検出することを特徴とするエンテロウイルスの検出法。

【請求項2】 (i) 血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つV p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、該増

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

で示される塩基配列を有し、下流の型共通部分に相補性

TGGTGGTGGGAAGTTGCCTGA (2)

で示される配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1又は2のエンテロウイルスの検出または識別方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、エンテロウイルスを高感度に検出し、血清型を識別する方法に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】 ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) に属するエンテロウイルス (Enterovirus) はおよそ70種類の血清型、同じくピコルナウイルス科に属するライノウイルス (Rhinovirus) はおよそ100種類の血清型に分類されており、多彩な感染症を示し、臨床症状から原因となるウイルスを推定することは困難である。そのため、病原体を確定するにはウイルスの分離同定が必要となる。しかし、現在のエンテロウイルス分離同定法は、培養法を用いてウイルスを分離し、同定のためには更に中和試験が必要になる。そしてこれらウイルスの分離培養には2~4週間が必要である。さらに標準株の中和抗血清を使用した中和試験は血清型鑑別不可能な分離株が頻繁に出現する。これはエンテロウイルスの遺伝子が自然界では極めて高速で変異をするためと考えられており、これらの解決には常に新鮮分離株を中和する抗血清の作製が必要となる。感染症の病原体の直接検出法として、クラミジア (Chlamydia) 等ではDNAプローブを用いて短時間に検出する方法が確立されている。しかし、その検出感度は低く、エンテロウイルスではプローブ法に必要なウイルス量が患者検体から得られず、更に

幅遺伝子DNAをマイクロプレートに固相化し、

(ii) 血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つV p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅および標識して血清型識別用DNAプローブとし、

(iii) 該DNAプローブを上記(i)のDNA固相化マイクロプレートに加えて、峻厳条件下でハイブリダイゼーションさせ、結合プローブの種類を解析することを特徴とするエンテロウイルスの血清型識別方法。

【請求項3】 (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドが次の配列(1)

を有するオリゴヌクレオチドが次の配列(2)

既述のようにエンテロウイルスの遺伝子が極めて高速に変異をするため、標準株のオリゴプローブでは同定の困難が予想される。高感度、特異的にDNAを増幅するポリメラーゼ・チェーン・リアクション法 [Polymerase Chain Reaction 法、以下これを「PCR法」と略記する; Saikiら, Science, 230巻, p1350-1354, 1985年参照] が開発されてから、5' -非翻訳領域の塩基配列に相補的なプライマーを用いたPCR法や、5' -非翻訳領域内、V p 4とV p 2蛋白をコードする遺伝子領域の塩基配列に相補性を有するプライマーを用いたPCR法で、エンテロウイルスが検出されている [Rotbart, H., 5. J. Clinical microbiology., 28 438-442(1990); Olive, D., M., 5 J. general Virology., 71, 2141-2147(1990)]。しかしながら、これらの方法は、エンテロウイルスの血清型を識別することができず、従ってより高い精度でエンテロウイルスを検出し、かつ血清型の鑑別が可能な方法が求められている。

##### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、エンテロウイルスやライノウイルス等のピコルナウイルスを高い精度で検出できるとともに、高い精度でエンテロウイルスの血清型を鑑別することができる方法の提供を目的とする。

##### 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を有する、V p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を含む領域を増

幅し、この増幅遺伝子DNAを検出することによりエンテロウイルス等のピコルナウイルスの高感度な検出が可能であること、さらにこの増幅遺伝子DNAを、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株を用いて前記と同一の領域を増幅および標識して作製したDNAプローブと峻厳条件下で結合させ、結合標識DNAを検出し、結合したプローブの種類を解析することにより、エンテロウイルスの高精度な血清型の識別が可能なることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0005】かくして、本発明によれば、

1. (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、

(ii) 該増幅遺伝子DNAを検出することを特徴とするエンテロウイルスの検出法、

2. (i) 血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライ

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

で示される塩基配列を有し、下流の型共通部分に相補性

TGGTGGTGAAGTTGCCTGA (2)

で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、上記1又は2のエンテロウイルスの検出または識別方法が提供される。

【0006】以下本発明のエンテロウイルスの検出および識別方法について更に詳細に説明する。本明細書において、「ピコルナウイルス」とは、エンベロープのないエーテル耐性の正二十面体対称の粒子で、直径20~30nmであり、中心に1本鎖RNAを持ち、このRNAの分子量は約 $2.5 \times 10^6$ であり、感染性を有し、かつmRNAの機能を有するウイルス粒子を意味するものである。また「エンテロウイルス」とは、上記ピコルナウイルス科に属し、かつpH3.0で安定であり、CsCl中での浮上密度が $1.32 \sim 1.35 \text{ g/cm}^3$ であるウイルス粒子を意味し、このエンテロウイルス属にはコクサッキーA群ウイルス、コクサッキーB群ウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス、ポリオウイルス等が含まれる。さらに「ライノウイルス」とは、上記ピコルナウイルス科に属し、かつpH3.0で不安定であり、CsCl中での浮上密度が $1.38 \sim 1.40 \text{ g/cm}^2$ であるウイルス粒子を意味するものである。本発明の一つの特徴は、血清型が未知のエンテロウイルス分離株由来の遺伝子の一部を増殖し、同一領域を増幅および標識した血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の遺伝子より作製したDNAプローブと峻厳条件下のハイブリダイ

マーとして用い、血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、該増幅遺伝子DNAをマイクロプレートに固相化し、(ii) 血清型が既知の流行エンテロウイルスの分離株の5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅および標識して血清型識別用DNAプローブとし、(iii) DNAプローブを上記

(i) のDNA固相化マイクロプレートに加えて、峻厳条件下でハイブリダイゼーションさせ、結合プローブの種類を解析することを特徴とするエンテロウイルスの血清型識別方法、

3. (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドが、次の配列(1)

を有するオリゴヌクレオチドが、次の配列

ゼーションで結合させ、結合したプローブの種類を解析することにより、エンテロウイルスを検出すると共に、このエンテロウイルスの血清型を識別することにある。このような方法により、エンテロウイルスを高い精度で検出することができると共に、エンテロウイルスの血清型を識別することが可能となる。

【0007】エンテロウイルスは、血清型がおよそ70種あり、また各血清型間が近縁なため、通常のハイブリダイゼーション条件では血清型の識別が困難であり、血清型の識別に際しては、本発明で用いる峻厳条件下でのハイブリダイゼーションを用いるのが好ましい。ここで、峻厳条件下でのハイブリダイゼーションとは、ホルムアミドの存在下でのハイブリダイゼーションを意味するものである。このハイブリダイゼーション条件におけるホルムアミドの存在量は、通常20~70%、特に40~60%の範囲内が好ましく、反応温度は40~70℃、特に40~60℃の範囲内が好ましい。反応時間には特に制限はないが、通常1~24時間の範囲内が適当である。上記峻厳条件下でのハイブリダイゼーションにおいては、同一血清型内においても標準株と分離株(ポリオウイルスの場合はワクチン株と分解株)が区別されてしまい、分離株の血清型の識別が不可能であるが、血清型識別用DNAプローブ作成用のエンテロウイルス遺伝子DNA源として、血清型が既知の流行エンテロウイ

ルス分離株（すなわち過去10年以内に流行し分離されたエンテロウイルス株）を用いて作成された血清型識別用DNAプローブを用いて、上記峻厳条件下でハイブリダイゼーションを行い、結合パターンを解析することにより、各エンテロウイルスの検出および血清型の識別が可能となる。

【0008】エンテロウイルスの血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域、すなわち「エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域」の増幅は次のとおり行うことができる。まず、診察時に採取した髄液等の臨床検体、臨床検体からの分離培養株、継代培養されている血清型が既知のエンテロウイルス標準株等から常法によりRNAを抽出し、この抽出RNAを逆転写酵素を用いcDNAを作製する。このcDNAに血清型特異的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、すなわち「エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド」をプライマーとして加えて、エンテロウイルスの5' -非翻訳領域、Vp4とVp2をコードする遺伝子領域を含む長さが約650塩基の遺伝子DNA領域を増幅する。遺伝子の増幅は、通常用いられるPCR法〔この

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド

TGGTGGTGAAGTTGCCTGA (2)

で示される塩基配列を有するプライマーを用いるのがより好ましい。上述したプライマーの化学合成は、それ自体既知の通常用いられる核酸合成機、例えばアプライド・バイオシステム社製、モデル381-A DNA合成機等を用いる固相合成法により容易に行うことができる。上記の如くしてPCR法により増幅したエンテロウイルスの血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域DNAは、通常用いられるポリアクリルアミドゲル電気泳動、アガロースゲル電気泳動等により分離し、バンドとして検出することができ、これによりエンテロウイルス由来の遺伝子DNAを確認することができる。なお電気泳動後のDNAバンドの検出は、エチジウム・ブロマイドで染色し、紫外線照射により容易に行うことができる。

【0011】上記に詳述した方法によって得られる「血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域」のDNAを常法により変性させ、マイクロプレート上に固定化してサンプルDNAとする（以下これを「固相化DNA」ということがある）。一方、上記と同様の方法で「血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白

PCR法の詳細については、特開昭61-274697号公報、特開昭62-281号公報、SakaiらScience 239巻、p487-491参照）により容易に行うことができる。

【0009】エンテロウイルスの血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域の増幅に際して、プライマーとして用いることができるオリゴヌクレオチドとしては、血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド、すなわち「エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド」を同時に用いるのであれば、いかなるオリゴヌクレオチドであってもよい。それらの中で、好ましくは既知の血清型特異的塩基配列データをもとに、エンテロウイルスに特異的かつ種間で共通性の高い塩基配列を5' -非翻訳領域（上流の型共通部分）とVp2領域（下流の型共通部分）に設定し、その塩基配列に基づいて化学合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるのが適当である。

【0010】化学合成したプライマー、すなわちエンテロウイルス特異的遺伝子領域の上流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドとしては、下記配列

(1)

が下記配列(2)

の一部をコードする遺伝子領域」のDNAを増幅および標識して血清型識別用DNAプローブとすることができる。この血清型識別用DNAプローブの標識は、例えば、DNA増幅反応に用いるdTTPの一部をビオチン dUTPに変更して用いて、DNA増幅を行うことにより容易に実施できる。

【0012】かくして得られる各種の血清型識別用DNAプローブを変性させた後、上記固相化DNA（サンプルDNA）に加えて、前記峻厳条件下でハイブリダイゼーションさせ、固相化DNAへ結合した血清型識別用DNAプローブの種類および量を、酵素標識アビジン等を用いて検出することにより、固相化DNA（サンプルDNA）の調製に用いたエンテロウイルスの血清型を識別することができる。

【0013】

【実施例】以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1 ピコルナウイルス標準株の検出及び血清型の識別

(A) 使用微生物

国立予防衛生研究所において継代培養されている下記31種類の血清型ピコルナウイルス標準株を用いて実験を行った。これらのピコルナウイルスは、いずれも特異抗

血清を用いた中和試験で血清型が同定されている標準株である。

【0014】

【表1】

株名 (血清型)		略号
コクサッキーA群ウイルス	2型	A 2
〃	3〃	A 3
〃	4〃	A 4
〃	8〃	A 8
〃	9〃	A 9
コクサッキーB群ウイルス	1型	B 1
〃	2〃	B 2
〃	3〃	B 3
〃	4〃	B 4
〃	5〃	B 5
〃	6〃	B 6
エコーウイルス	3型	E 3
〃	4〃	E 4
〃	5〃	E 5
〃	6〃	E 6
〃	9〃	E 9
〃	11〃	E 11
〃	14〃	E 14
〃	16〃	E 16
〃	18〃	E 18
〃	19〃	E 19
〃	24〃	E 24
〃	25〃	E 25
〃	27〃	E 27
〃	30〃	E 30
エンテロウイルス	71型	E 71
ポリオウイルス	1型	P V 1
〃	2〃	P V 2
〃	3〃	P V 3
ライノウイルス	3型	R H 3
〃	7〃	R H 7

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

TGGTGGTGGGAAGTTGCCTGA (2)

の塩基配列で示される20塩基のプライマーを、ホスホアミダイト (Phosphoramidite)法によりアプライド・バイオシステム社製、モデル381-A DNA合成機を用いて合成し、OPC<sub>TM</sub>カートリッジを用いて精製し、PCRのプライマーとして使用した。

【0017】(E) 固相化DNA調製用遺伝子 (サンプルDNA) の増幅 (PCR)

反応液として、10<sub>x</sub> 反応用緩衝液 (Reaction Buffer) 10 $\mu$ l、デオキシヌクレオチド3-リン酸混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ;各1.25mM含有) 16 $\mu$ l、上記合成プライマー (1) (50 $\mu$ M) 2.0 $\mu$ l、上記合成プライマー (2) (50 $\mu$ M) 2.0 $\mu$ l、前記

(C) 項で合成したピコルナウイルスcDNA 100ng~1 $\mu$ g、およびTaqポリメラーゼ (宝酒造製) 1 $\mu$ l (5Unit) に蒸留水を加え、計100 $\mu$ lとしたものを調製した。1サイクルは、塩基酸の変性工程を95

【0015】(B) RNAの抽出

上記各ウイルス液を15%シュクロースによる超遠心操作により沈殿させた後、その沈殿物を Tris-EDTAにて回収し、フェノール/クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿を行った。

(C) cDNAの合成

前記 (B) 項で得た各RNAを鋳型としてリバーストランスクリプターゼ (Bethesda Research Laboratories)を用いて、各ウイルスに由来するcDNAを合成した。

【0016】(D) PCR用プライマーの合成

前記 (A) 項のピコルナウイルスの遺伝子を共通に増幅できるプライマーペアを、血清型特異的な塩基配列を持つVp4及びVp2蛋白をコードする遺伝子領域の塩基配列をもとに、5'-非翻訳領域とVp2領域の各々に相補性を有する下記配列 (1) および配列 (2)、

℃30秒、アニーリング工程を45℃1分、塩基鎖伸長工程を72℃2分に設定し、アンプリフィケーション・システム (amplification system ;シータス社) を用いて、標的DNAを35サイクル増幅した。この増幅遺伝子を固相化用サンプルDNAとして用いた。

【0018】(F) 血清型識別用DNAプローブ調製用遺伝子の増幅 (PCR)

反応液として10<sub>x</sub> 反応用緩衝液 (Reaction Buffer) 10 $\mu$ l、デオキシヌクレオチド3-リン酸混合液 (dATP, dCTP, dGTP ;各1.25mM dTTP ;0.94mM) 16 $\mu$ l、Biotin-11-dUTP (Enzo Diagnostics) 16.7 $\mu$ l、上記合成プライマー (1) (50 $\mu$ M) 2.0 $\mu$ l、上記合成プライマー (2) (50 $\mu$ M) 2.0 $\mu$ l、前記

(C) 項で合成したピコルナウイルスcDNA100ng~1 $\mu$ g およびTaqポリメラーゼ (宝酒造) 1 $\mu$ l (5Unit) に蒸留水を加え、計100 $\mu$ lとしたものを

調製した。1 サイクルは、塩基鎖の変性工程を 95℃ 30 秒、アニーリング工程を 45℃ 1 分、塩基鎖伸長工程を 72℃ 2 分に設定し、アンプリフィケーション システム（シータス社）を用いて標的 DNA を 35 サイクル増幅した。このピオチンで標識された遺伝子 DNA を血清型識別用 DNA プローブとして用いた。

【0019】 (G) ゲル電気泳動法による増幅遺伝子 DNA の確認

3.0% のアガロースゲルにエチジウムブロマイドを 0.5 µg/ml 加え、上記 (E) および (F) 項で増幅した DNA の電気泳動を行った。泳動後 254 nm の紫外線を照射し、エチジウムブロマイドの発色反応により DNA バンドを検出し、エンテロウイルスの 5' 非翻訳領域の一部と血清型に特異的な塩基配列を持つ Vp4 および Vp2 蛋白の一部をコードする遺伝子領域に由来する約 650 塩基の標的 DNA バンドを確認した。

(H) 増幅 DNA の精製および濃度測定

前記 (E) および (F) 項で増幅した遺伝子 DNA をフェノール/クロロホルムにて抽出後、エタノールを用いて沈殿させ回収し、濃度を 260 nm の吸光度により算出した。

【0020】 (I) プレートハイブリダイゼーション  
マイクロプレート固相法 (Inouye Hondo, J. Clin. Microbiol. 28 : 1469, 1990) の変法により行った。上記

(H) 項で精製したサンプル DNA を熱変性後、50 ng / 100 µl/well を、1.5 M NaCl、10 mM リン酸ナトリウム、10 mM EDTA 存在下でマイクロプレート (NUNC-IMMUNO PLATE MAXISORP F96) に 37℃ 2 時間で固相化した。これを PBS-Tween 20 で 3 回洗浄し未反応サンプル DNA を除去した。ハイブリダイゼーシ

ョンは前記 (H) 項で精製した血清型識別用 DNA プローブを熱変性後、1.25 ng / 100 µl/well を、50 % ホルムアミド、0.75 M NaCl、0.1 % Tween 20、Salmon sperm 50 µg/ml の存在下で前記マイクロプレートに 50℃ 8 時間行った。ハイブリダイゼーション後、マイクロプレートを PBS-Tween 20 で 3 回洗浄し、未反応血清型識別用 DNA プローブを除去した。次にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンの 1 : 1,000 希釈液 (1 % BSA、0.1 % Triton X-100、PBS-Tween 20) を滴下、室温 2 時間反応させた。再びマイクロプレートを PBS-Tween 20 で 3 回洗浄後、0.012 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.04 % オルトフェニレンジアミン、0.05 / 0.024 M リン酸ナトリウム-クエン酸 (pH 5.0) を 100 µl/well となるように加え、室温で 30 分、遮光状態で反応させ、4N 硫酸 50 µl/well を加え反応を停止させた。反応によって生じたマイクロプレートの着色量を、マイクロプレートリーダー (パイオラッド社製) を用いて波長 492 nm で吸光度 (OD) を測定した。各マイクロプレートの吸光度から血清型識別用 DNA プローブの結合率 (%) を次のとおり求めた。

結合率 (%) = (互に異なる血清型ウイルス由来の固相化 DNA と識別用 DNA プローブとのハイブリダイゼーションの OD 値 ÷ 同一血清型ウイルス由来の固相化 DNA と識別用 DNA プローブとのハイブリダイゼーションの OD 値) × 100。

その結果を第 1 表に示す。なお、第 1 表中の空白欄は、いずれも結合 10 % 未満の値である。

【0021】

【表 2】

第1表  
標準株の型鑑別 (結合率: %)

	血 清 型										ロ ッ プ 用 別										プ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	B1	B2	B3	B4	B5	B6	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E44	E45	E46	E47	E48	E49	E50	E51	E52	E53	E54	E55	E56	E57	E58	E59	E60	E61	E62	E63	E64	E65	E66	E67	E68	E69	E70	E71	E72	E73	E74	E75	E76	E77	E78	E79	E80	E81	E82	E83	E84	E85	E86	E87	E88	E89	E90	E91	E92	E93	E94	E95	E96	E97	E98	E99	E100	E101	E102	E103	E104	E105	E106	E107	E108	E109	E110	E111	E112	E113	E114	E115	E116	E117	E118	E119	E120	E121	E122	E123	E124	E125	E126	E127	E128	E129	E130	E131	E132	E133	E134	E135	E136	E137	E138	E139	E140	E141	E142	E143	E144	E145	E146	E147	E148	E149	E150	E151	E152	E153	E154	E155	E156	E157	E158	E159	E160	E161	E162	E163	E164	E165	E166	E167	E168	E169	E170	E171	E172	E173	E174	E175	E176	E177	E178	E179	E180	E181	E182	E183	E184	E185	E186	E187	E188	E189	E190	E191	E192	E193	E194	E195	E196	E197	E198	E199	E200	E201	E202	E203	E204	E205	E206	E207	E208	E209	E210	E211	E212	E213	E214	E215	E216	E217	E218	E219	E220	E221	E222	E223	E224	E225	E226	E227	E228	E229	E230	E231	E232	E233	E234	E235	E236	E237	E238	E239	E240	E241	E242	E243	E244	E245	E246	E247	E248	E249	E250	E251	E252	E253	E254	E255	E256	E257	E258	E259	E260	E261	E262	E263	E264	E265	E266	E267	E268	E269	E270	E271	E272	E273	E274	E275	E276	E277	E278	E279	E280	E281	E282	E283	E284	E285	E286	E287	E288	E289	E290	E291	E292	E293	E294	E295	E296	E297	E298	E299	E300	E301	E302	E303	E304	E305	E306	E307	E308	E309	E310	E311	E312	E313	E314	E315	E316	E317	E318	E319	E320	E321	E322	E323	E324	E325	E326	E327	E328	E329	E330	E331	E332	E333	E334	E335	E336	E337	E338	E339	E340	E341	E342	E343	E344	E345	E346	E347	E348	E349	E350	E351	E352	E353	E354	E355	E356	E357	E358	E359	E360	E361	E362	E363	E364	E365	E366	E367	E368	E369	E370	E371	E372	E373	E374	E375	E376	E377	E378	E379	E380	E381	E382	E383	E384	E385	E386	E387	E388	E389	E390	E391	E392	E393	E394	E395	E396	E397	E398	E399	E400	E401	E402	E403	E404	E405	E406	E407	E408	E409	E410	E411	E412	E413	E414	E415	E416	E417	E418	E419	E420	E421	E422	E423	E424	E425	E426	E427	E428	E429	E430	E431	E432	E433	E434	E435	E436	E437	E438	E439	E440	E441	E442	E443	E444	E445	E446	E447	E448	E449	E450	E451	E452	E453	E454	E455	E456	E457	E458	E459	E460	E461	E462	E463	E464	E465	E466	E467	E468	E469	E470	E471	E472	E473	E474	E475	E476	E477	E478	E479	E480	E481	E482	E483	E484	E485	E486	E487	E488	E489	E490	E491	E492	E493	E494	E495	E496	E497	E498	E499	E500	E501	E502	E503	E504	E505	E506	E507	E508	E509	E510	E511	E512	E513	E514	E515	E516	E517	E518	E519	E520	E521	E522	E523	E524	E525	E526	E527	E528	E529	E530	E531	E532	E533	E534	E535	E536	E537	E538	E539	E540	E541	E542	E543	E544	E545	E546	E547	E548	E549	E550	E551	E552	E553	E554	E555	E556	E557	E558	E559	E560	E561	E562	E563	E564	E565	E566	E567	E568	E569	E570	E571	E572	E573	E574	E575	E576	E577	E578	E579	E580	E581	E582	E583	E584	E585	E586	E587	E588	E589	E590	E591	E592	E593	E594	E595	E596	E597	E598	E599	E600	E601	E602	E603	E604	E605	E606	E607	E608	E609	E610	E611	E612	E613	E614	E615	E616	E617	E618	E619	E620	E621	E622	E623	E624	E625	E626	E627	E628	E629	E630	E631	E632	E633	E634	E635	E636	E637	E638	E639	E640	E641	E642	E643	E644	E645	E646	E647	E648	E649	E650	E651	E652	E653	E654	E655	E656	E657	E658	E659	E660	E661	E662	E663	E664	E665	E666	E667	E668	E669	E670	E671	E672	E673	E674	E675	E676	E677	E678	E679	E680	E681	E682	E683	E684	E685	E686	E687	E688	E689	E690	E691	E692	E693	E694	E695	E696	E697	E698	E699	E700	E701	E702	E703	E704	E705	E706	E707	E708	E709	E710	E711	E712	E713	E714	E715	E716	E717	E718	E719	E720	E721	E722	E723	E724	E725	E726	E727	E728	E729	E730	E731	E732	E733	E734	E735	E736	E737	E738	E739	E740	E741	E742	E743	E744	E745	E746	E747	E748	E749	E750	E751	E752	E753	E754	E755	E756	E757	E758	E759	E760	E761	E762	E763	E764	E765	E766	E767	E768	E769	E770	E771	E772	E773	E774	E775	E776	E777	E778	E779	E780	E781	E782	E783	E784	E785	E786	E787	E788	E789	E790	E791	E792	E793	E794	E795	E796	E797	E798	E799	E800	E801	E802	E803	E804	E805	E806	E807	E808	E809	E810	E811	E812	E813	E814	E815	E816	E817	E818	E819	E820	E821	E822	E823	E824	E825	E826	E827	E828	E829	E830	E831	E832	E833	E834	E835	E836	E837	E838	E839	E840	E841	E842	E843	E844	E845	E846	E847	E848	E849	E850	E851	E852	E853	E854	E855	E856	E857	E858	E859	E860	E861	E862	E863	E864	E865	E866	E867	E868	E869	E870	E871	E872	E873	E874	E875	E876	E877	E878	E879	E880	E881	E882	E883	E884	E885	E886	E887	E888	E889	E890	E891	E892	E893	E894	E895	E896	E897	E898	E899	E900	E901	E902	E903	E904	E905	E906	E907	E908	E909	E910	E911	E912	E913	E914	E915	E916	E917	E918	E919	E920	E921	E922	E923	E924	E925	E926	E927	E928	E929	E930	E931	E932	E933	E934	E935	E936	E937	E938	E939	E940	E941	E942	E943	E944	E945	E946	E947	E948	E949	E950	E951	E952	E953	E954	E955	E956	E957	E958	E959	E960	E961	E962	E963	E964	E965	E966	E967	E968	E969	E970	E971	E972	E973	E974	E975	E976	E977	E978	E979	E980	E981	E982	E983	E984	E985	E986	E987	E988	E989	E990	E991	E992	E993	E994	E995	E996	E997	E998	E999	E1000	E1001	E1002	E1003	E1004	E1005	E1006	E1007	E1008	E1009	E1010	E1011	E1012	E1013	E1014	E1015	E1016	E1017	E1018	E1019	E1020	E1021	E1022	E1023	E1024	E1025	E1026	E1027	E1028	E1029	E1030	E1031	E1032	E1033	E1034	E1035	E1036	E1037	E1038	E1039	E1040	E1041	E1042	E1043	E1044	E1045	E1046	E1047	E1048	E1049	E1050	E1051	E1052	E1053	E1054	E1055	E1056	E1057	E1058	E1059	E1060	E1061	E1062	E1063	E1064	E1065	E1066	E1067	E1068	E1069	E1070	E1071	E1072	E1073	E1074	E1075	E1076	E1077	E1078	E1079	E1080	E1081	E1082	E1083	E1084	E1085	E1086	E1087	E1088	E1089	E1090	E1091	E1092	E1093	E1094	E1095	E1096	E1097	E1098	E1099	E1100	E1101	E1102	E1103	E1104	E1105	E1106	E1107	E1108	E1109	E1110	E1111	E1112	E1113	E1114	E1115	E1116	E1117	E1118	E1119	E1120	E1121	E1122	E1123	E1124	E1125	E1126	E1127	E1128	E1129	E1130	E1131	E1132	E1133	E1134	E1135	E1136	E1137	E1138	E1139	E1140	E1141	E1142	E1143	E1144	E1145	E1146	E1147	E1148	E1149	E1150	E1151	E1152	E1153	E1154	E1155	E1156	E1157	E1158	E1159	E1160	E1161	E1162	E1163	E1164	E1165	E1166	E1167	E1168	E1169	E1170	E1171	E1172	E1173	E1174	E1175	E1176	E1177	E1178	E1179	E1180	E1181	E1182	E1183	E1184	E1185	E1186	E1187	E1188	E1189	E1190	E1191	E1192	E1193	E1194	E1195	E1196	E1197	E1198	E1199	E1200	E1201	E1202	E1203	E1204	E1205	E1206	E1207	E1208	E1209	E1210	E1211	E1212	E1213	E1214	E1215	E1216	E1217	E1218	E1219	E1220	E1221	E1222	E1223	E1224	E1225	E1226	E1227	E1228	E1229	E1230	E1231	E1232	E1233	E1234	E1235	E1236	E1237	E1238	E1239	E1240	E1241	E1242	E1243	E1244	E1245	E1246	E1247	E1248	E1249	E1250	E1251	E1252	E1253	E1254	E1255	E1256	E1257	E1258	E1259	E1260	E1261	E1262	E1263	E1264	E1265	E1266	E1267	E1268	E1269	E1270	E1271	E1272	E1273	E1274	E1275	E1276	E1277	E1278	E1279	E1280	E1281	E1282	E1283	E1284	E1285	E1286	E1287	E1288	E1289	E1290	E1291	E1292	E1293	E1294	E1295	E1296	E1297	E1298	E1299	E1300	E1301	E1302	E1303	E1304	E1305	E1306	E1307	E1308	E1309	E1310	E1311	E1312	E1313	E1314	E1315	E1316	E1317	E1318	E1319	E1320	E1321	E1322	E1323	E1324	E1325	E1326	E1327	E1328	E1329	E1330	E1331	E1332	E1333	E1334	E1335	E1336	E1337	E1338	E1339	E1340	E1341	E1342	E1343	E1344	E1345	E1346	E1347	E1348	E1349	E1350	E1351	E1352	E1353	E1354	E1355	E1356	E1357	E1358	E1359	E1360	E1361	E1362	E1363	E1364	E1365	E1366	E1367	E1368	E1369	E1370	E1371	E1372	E1373	E1374	E1375	E1376	E1377	E1378	E1379	E1380	E1381	E1382	E1383	E1384	E1385	E1386	E1387	E1388	E1389	E1390	E1391	E1392	E1393	E1394	E1395	E1396	E1397	E1398	E1399	E1400	E1401	E1402	E1403	E1404	E1405	E1406	E1407	E1408	E1409	E1410	E1411	E1412	E1413	E1414	E1415	E1416	E1417	E1418	E1419	E1420	E1421	E1422	E1423	E1424	E1425	E1426	E1427	E1428	E1429	E1430	E1431	E1432	E1433	E1434	E1435	E1436	E1437	E1438	E1439	E1440	E1441	E1442	E1443	E1444	E1445	E1446	E1447	E1448	E1449	E1450	E1451	E1452	E1453



株名 (血清型)	分離時期
コクサッキーA群ウイルス4型 (A4)	
1155/72	1972年
1361/82	1982年
0269/84	1984年
0025/86	1986年
0023/87	1987年
0406/89	1989年
0313/91	1991年
エコーウイルス11型 (E11)	
1036/71	1971年
1183/77	1977年
1149/87	1987年
3137/81	1981年
1303/83	1983年
0798/84	1984年
0400/85	1985年
0107/90	1990年
エンテロウイルス71型 (E71)	
ナゴヤ/70	1970年
3059/78	1978年
3359/83	1983年
4132/85	1985年
236a/86	1986年
236c/86	1986年
0253/86	1986年
2587/89	1989年
4094/90	1990年

【0024】 (2) 標準株  
【表4】

コクサッキーA群ウイルス	4型 (A4)
コクサッキーB群ウイルス	2 (B2)
〃	3 (B3)
〃	5 (B5)
エコーウイルス	9 (E9)
〃	11 (E11)
〃	30 (E30)
エンテロウイルス	71 (E71)
ポリオウイルス	3 (PV3)

【0025】 (B) 実験方法および結果  
上記の各ウイルスから実施例1の (B) 項記載の方法に

よりRNAを抽出し、同 (C) 項記載の方法で各cDNAを合成した。更に同 (E) 項記載の方法で固相化DNA調製用遺伝子を増幅し、同 (F) 項記載の方法で血清型識別用DNAプローブ調製用遺伝子を増幅し、これらの増幅遺伝子DNAについて同 (G) 項記載のゲル電気泳動を行った結果、用いた全ての株に由来する増幅遺伝子DNAバンドが確認できた。これら増幅遺伝子DNAを同 (H) 項記載の方法で精製し、濃度測定を行った後に、同 (I) 項記載と同様にプレートハイブリダイゼーションさせ、各プローブの結合率 (%) を算出した。その結果を第2表～第4表に示す。なお、表中の空白欄は結合率が10%以下の値である。

【0026】  
【表5】

第 2 表  
 コクサッキーA群ウイルス4型（A4）分離株の型鑑別（結合率：％）

			血清型識別用 D N A プ ロ ー プ						
			1155/72	1361/82	0269/84	0025/86	0023/87	0406/89	0313/91 標準株A4
固 相 化 D N A	分 離 株	1155/72	100						
		1361/82		100					
		0269/84			100	63	50	50	58
		0025/86			81	100	60	43	50
		0023/87			50	44	100	36	33
		0406/89			56	44	36	100	100
		0313/91			56	44	29	79	100
標 準 株	A4 B2 B3 B5 E9 E11 E30 E71 PV3	A4							100
		B2							
		B3							
		B5							
		E9							
		E11							
		E30							
		E71							
		PV3							

【0027】

【表6】

【0028】

第3表  
エコーウイルス11型（E11）分離株の型鑑別（結合率：％）

			血清型鑑別用DNAプロープ									
固相	E11	分離株	1036/71	1183/77	1149/78	3137/81	1303/83	0798/84	0400/85	0107/90	標準株E11	
			100	100		37	37		33	23		
DNA	標準株	1036/71	100									
		1183/77										
		1149/78			100	20	22		20			
		3137/81	43		23	100	111	103	117	92		
		1303/83	33		20	73	100	76	108	81		
		0798/84	20			93	100	100	104	81		
		0400/85	33		20	80	93	76	100	77		
		0107/90	23			67	78	62	79	100		
		A4										
		B2										
		B3										
		B5										
		E9										
		E11										
		E30										
		E71										
		PV3										

【表7】

第4表  
エンテロウイルス71型 (E71) 分離株の型鑑別 (結合率: %)

		血清型識別用 DNA プローブ											
		70	78	83	85	86a	86c	86	86	86	89	90	標準株E71
固相化 DNA	70	100	110	100	84	98	90	89					
	78	75	100	64	105	75	62	63					
	83	82	85	100	100	82	83	85	22				
	85	79	95	73	100	71	69	63	26	38			
	86a	82	90	91	84	100	97	93					
	86c	89	100	100	58	104	100	100					
	86	82	90	95	84	104	93	100					
	89			32	37				100	119			
標準株	89				37				78	100			
	90												
	93												
	100												
	104												
	104												
	104												
	104												100

【0029】第2表～第4表に示す結合パターンから明らかとなり、用いたエンテロウイルス分離株の全てのDNAプローブと各血清型の標準株由来の固相化DNAとの間に同一血清型間においても交差反応は認められなかった。一方、各血清型内の分離株については、およそ10年以内に分離された (同一血清型間の) 流行ウイルス分離株で高い交差反応が認められた。以上の結果が

ら、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株 (およそ10年以内に分離された株) の前記血清型に特異的な塩基配列を持つ遺伝子領域を増幅して、得られる血清型識別用DNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行えば、容易に流行エンテロウイルスの検出および血清型の識別が可能であることが判明した。

フロントページの続き

- (72)発明者 石古 博昭  
東京都板橋区志村 3-30-1 株式会社三  
菱油化ビーシーエル内
- (72)発明者 柴 賢司  
愛知県名古屋市中区北区辻町字流 7-6 愛知  
県立衛生研究所内
- (72)発明者 石原 佑弐  
愛知県名古屋市中区北区辻町字流 7-6 愛知  
県立衛生研究所内

- (72)発明者 武田 直和  
東京都新宿区戸山 1-23-1 国立予防衛  
生研究所内
- (72)発明者 宮村 紀久子  
東京都新宿区戸山 1-23-1 国立予防衛  
生研究所内
- (72)発明者 井上 栄  
東京都新宿区戸山 1-23-1 国立予防衛  
生研究所内